

## PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE

**Patent number:** WO9106565  
**Publication date:** 1991-05-16  
**Inventor:** YANAIHARA NOBORU (JP)  
**Applicant:** MEIJI SEIKA KAISHA (JP); DAICEL CHEM (JP)  
**Classification:**  
- **international:** C07K14/46; C07K14/575; C07K14/665; A61K38/00;  
C07K14/435; A61K38/00; (IPC1-7): A61K37/02;  
C07K7/10  
- **european:** C07K14/46; C07K14/575L; C07K14/665  
**Application number:** WO1990JP01384 19901026  
**Priority number(s):** JP19890277267 19891026

**Also published as:**

- EP0450100 (A1)
- JP4193896 (A)
- EP0450100 (A4)

**Cited documents:**

- JP61118399

[Report a data error here](#)

Abstract not available for WO9106565

Abstract of corresponding document: EP0450100

New chemically synthesized peptides of the following general formulae (I), (II), (III), which have a smooth muscle relaxant activity and can increase blood flow in the blood vessel. General formula (I): H-His-Ser-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Gln-Gln-Tyr-Ser-Lys-Leu-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Leu-Gln-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ser-Ile-Leu-Gly-Ser-Arg-Thr-X-NH<sub>2</sub>, wherein X represents a single bond, Ser or Ser-Pro, general formula (II): H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Lys-Leu-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Leu-Gln-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ser-Ile-Leu-Gly-Ser-Arg-Thr-NH<sub>2</sub>, general formula (III): H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-Ser-Arg-Thr-Ser-Pr o-Pro-Pro-NH<sub>2</sub>.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 <b>C07K 7/10, A61K 37/02</b>	A1	(11) 国際公開番号 <b>WO 91/06565</b>  (43) 国際公開日 <b>1991年5月16日 (16. 05. 1991)</b>
(21) 国際出願番号 <b>POT/JP90/01384</b> (22) 国際出願日 <b>1990年10月26日 (26. 10. 90)</b>		添付公開書類 <b>国際調査報告書</b>
(30) 優先権データ 特願平1/277267 1989年10月26日 (26. 10. 89) JP		
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 明治製薬株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) (JP/JP) 〒104 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo, (JP) ダイセル化学工業株式会社 (DAICEL OHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) (JP/JP) 〒590 大阪府茨木市鉄砲町1番地 Osaka, (JP)		
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 矢内原 卓 (YANAIHARA, Noboru) (JP/JP) 〒420 静岡県静岡市北403-22 Shizuoka, (JP)		
(74) 代理人 弁理士 八木田 茂, 外 (YAGITA, Shigeru et al.) 〒105 東京都港区西新橋1丁目1番15号 物産ビル別館 Tokyo, (JP)		
(81) 指定国 CH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), JP, US .		
(54) Title : PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE		
(54) 発明の名称 生理活性ペプチド		
(57) Abstract		
<p>New chemically synthesized peptides of the following general formulae (I), (II), (III), which have a smooth muscle relaxant activity and can increase blood flow in the blood vessel. General formula (I): H-His-Ser-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Gln-Gln-Tyr-Ser-Lys-Leu-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Leu-Gln-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ser-Ile-Leu-Gly-Ser-Arg-Thr-X-NH<sub>2</sub>, wherein X represents a single bond, Ser or Ser-Pro, general formula (II): H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Lys-Leu-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Leu-Gln-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ser-Ile-Leu-Gly-Ser-Arg-Thr-NH<sub>2</sub>, general formula (III): H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-Ser-Arg-Thr-Ser-Pro-Pro-Pro-NH<sub>2</sub>.</p>		

(57) 要約

本発明により化学合成されて下記の一般式(I)、式(II)及び式(III)で夫々に表わされる新規なペプチド類は、平滑筋弛緩作用を有して血管中の血流量を増加させる生理活性を有する。

一般式(I)：

H-His-Ser-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Gln-Gln-Tyr-Ser-Lys  
-Leu-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Leu-Gln-Lys-Tyr-Leu-Ala- (I)  
Ser-Ile-Leu-Gly-Ser-Arg-Thr-X-NH<sub>2</sub>

(式中、Xは結合手-、もしくはSer又はSer-Proを示す)。

一般式(II)：

H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Lys  
-Leu-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Leu-Gln-Lys-Tyr-Leu-Ala- (II)  
Ser-Ile-Leu-Gly-Ser-Arg-Thr-NH<sub>2</sub>

一般式(III)：

H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg  
-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn- (III)  
Ser-Ile-Leu-Asn-Ser-Arg-Thr-Ser-Pro-Pro-Pro-NH<sub>2</sub>

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のハンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	ES スペイン	MG マダガスカル
AU オーストラリア	FI フィンランド	ML マリ
BB バルバードス	FR フランス	MR モーリタニア
BE ベルギー	GA ガボン	MW マラウイ
BF ブルキナ・ファソ	GB イギリス	NL オランダ
BG ブルガリア	GR ギリシャ	NO ノルウェー
BJ ベナン	HU ハンガリー	PL ポーランド
BR ブラジル	IT イタリー	RO ルーマニア
CA カナダ	JP 日本	SD スーダン
CF 中央アフリカ共和国	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SE スウェーデン
CG コンゴー	KR 大韓民国	SN セネガル
CH スイス	LJ リヒテンシュタイン	SU ソビエト連邦
CI コートジボアール	LK スリランカ	TD チャード
CM カメルーン	LU ルクセンブルグ	TG トーゴ
DE 西ドイツ	MC モナコ	US 米国
DK デンマーク		

- 1 -

## 明細書

## 生理活性ペプチド

技術分野

5 本発明は平滑筋弛緩作用を有する新規な生理活性ペプチドに関する。

従来技術

哺乳動物の血管における血流増加作用を有する天然ペプチドとして、ヒトの腸管に存在するVIP  
 10 (Vasoactive intestinal polypeptide) や、毒トカゲの毒液より単離されたヘロデルミン(Helodermin)が知られている。しかしこれら天然ペプチドを医薬として使用するには、VIPは医薬効果の持続性が短かい点で、またヘロデルミンは筋肉弛緩の強度が低い点で且つその他の種々な点に問題がある。  
 15

ヘロデルミンは次式に示されるアミノ酸配列を有する構造をもつペプチドである。

H-His-Ser-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Gln-Gln-Tyr  
 -Ser-Lys-Leu-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Leu-Gln-Lys-Tyr-Leu  
 20 -Ala-Ser-Ile-Leu-Gly-Ser-Arg-Thr-Ser-Pro-Pro-NH<sub>2</sub>

また、VIPは次式に示されるアミノ酸配列を有する構造をもつペプチドである。

H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-  
 Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-  
 25 Ile-Leu-Asn-NH<sub>2</sub>

- 2 -

### 発明の開示

本発明者らは、前記ヘロデルミンや VIPに比べてより優れた生理活性を有する新規なペプチドを提供することを目的として研究を行った。その研究の結果、ヘロデルミンのアミノ酸配列の一部分から成り且つ下記の一般式(I)のペプチドとして表わされてヘロデルミンの誘導体とみなし得る新規な3種のペプチドを化学合成することに成功し、またこれらの新規ペプチドが血管平滑筋を弛緩させて血流増加を行う生理活性を有することを見出した。更に、本発明者らは、VIPのアミノ酸配列とヘロデルミンのアミノ酸配列の一部分とを組合わせ結合してなる新規なペプチド、並びにVIPのアミノ酸配列の一部分とヘロデルミンのアミノ酸配列の別の一部分とを組合わせ結合してなる新規なペプチドを化学合成することに成功し、またこれら後者の2種の新規ペプチドも上記の一般式(I)のペプチドと同様の生理活性を有することを見出した。

従って、第1の本発明によると、次の一般式(I)

H-His-Ser-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Gln-Gln-Tyr-Ser-Lys  
-Leu-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Leu-Gln-Lys-Tyr-Leu-Ala-  
Ser-Ile-Leu-Gly-Ser-Arg-Thr-X-NH<sub>2</sub> (I)

(式中、Xは結合手-、もしくはSer又はSer-Proを示す)で表わされるペプチドが提供される。

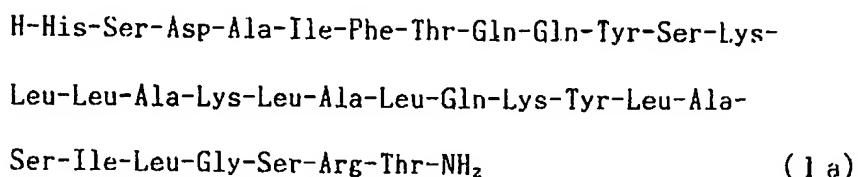
一般式(I)のペプチドは、ヘロデルミンのアミノ酸配列をなす35個のアミノ酸残基のうちで最終N末端か

- 3 -

ら32位～35位の4個のアミノ酸又は33位～35位の3個のアミノ酸又は34位～35位の2個のアミノ酸をヘロデルミン分子から欠失させるようにヘロデルミンを短縮させることにより作られた誘導体に相当するものであり、即ちヘロデルミンからの短縮ペプチド誘導体である。

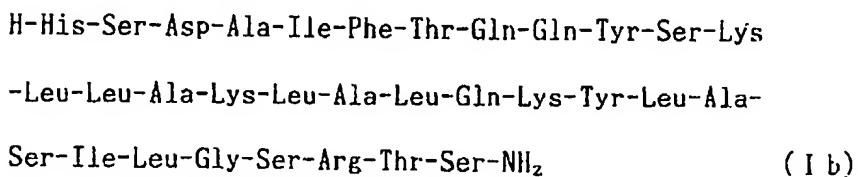
一般式(I)のペプチドは下記の3種のペプチド(Ia)、(Ib)及び(Ic)を包含する。

(i) 一般式(I)においてXが結合手ーを示す場合のペプチド、すなわち次式(Ia)



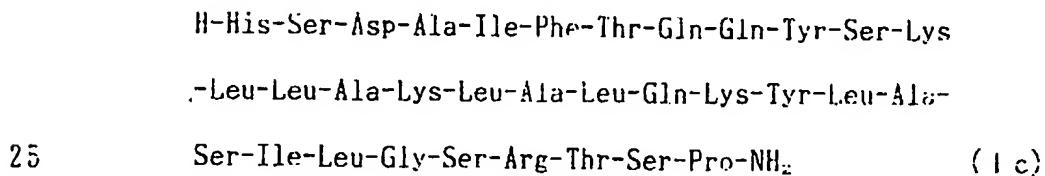
で表わされるペプチド。

(ii) 一般式(I)においてXがSerを示す場合のペプチド、すなわち次式(Ib)



で表わされるペプチド。

(iii) 一般式(I)においてXがSer-Proを示す場合のペプチド、すなわち次式(Ic)

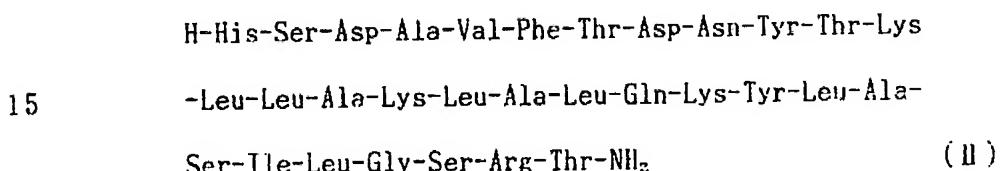


- 4 -

で表わされるペプチド。

式(I a)のペプチドは、ヘロデルミンのアミノ酸配列(35個のアミノ酸残基よりなる)のうちに存在する1位から31位までの部分のアミノ酸の配列からなる短縮ペプチド[以下、Hd(1-31)-NH<sub>2</sub>と略すことがある]であり、式(I b)のペプチドはヘロデルミンのアミノ酸配列のうちに存在する1位から32位までの部分のアミノ酸の配列からなる短縮ペプチド[以下、Hd(1-32)-NH<sub>2</sub>と略すことがある]であり、また式(I c)のペプチドはヘロデルミンのアミノ酸配列のうちに存在する1位から33位までの部分のアミノ酸の配列からなる短縮ペプチド[以下、Hd(1-33)-NH<sub>2</sub>と略すことがある]である。

更に、第2の本発明によると、次式(II)



で表わされるペプチドが提供される。

式(II)のペプチドは、VIPのアミノ酸配列をなす28個のアミノ酸残基のうちで1位(最終N末端に位置する)から11位までのアミノ酸の配列[以下、VIP(1-11)-NH<sub>2</sub>と略すことがある]と、ヘロデルミンの最終N末端より12位から31位までのアミノ酸の配列[以下、Hd-(12-31)-NH<sub>2</sub>と略すことがある]とを組合せ結合してなるペプチド[以下、VIP(1-11)-Hd(12-31)-NH<sub>2</sub>と略すことがある]である。

- 5 -

更に、第3の本発明によると、次式(Ⅲ)

H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg  
-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-  
Ser-Ile-Leu-Asn-Ser-Arg-Thr-Ser-Pro-Pro-Pro-NH<sub>2</sub> (Ⅲ)

5 で表わされるペプチドが提供される。

式(Ⅲ)のペプチドは、VIPのアミノ酸配列〔28個のアミノ酸残基よりなり、以下、VIP(1-28)と略すことがある〕と、ヘロデルミンの最終N末端より29位から35位までのアミノ酸の配列〔以下、Hd(29-35)と略すことある〕とを組合わせ結合してなるペプチド〔以下、VIP(1-28)-Hd(29-35)-NH<sub>2</sub>と略すことがある〕である。

一般式(I)のペプチド、式(II)のペプチド及び式(Ⅲ)のペプチドの各々は、イヌ大腿動脈における試験で血管平滑筋を弛緩させ、血流増加作用を示した。これら15のペプチドはヒトに対して有用な血流増加剤となりうる。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明による一般式(I)のペプチドに包含される式(Ia)、式(Ib)及び式(Ic)の各ペプチド、並びに式(II)のペプチド及び式(Ⅲ)のペプチドは、常套のペプチド合成法により固相法でも液相法でも化学合成される。

例えば、本発明の新規ペプチドは、多くの化学教科書及び論文に記載される公知の活性エステル法又は混合酸無水物法により常法で化学合成できるが、アミノ

- 6 -

酸を固定し得るアミノ官能基をもつ樹脂を用いる固相法で化学合成されるのが便利である。

以下に、本発明の新規ペプチドの化学合成を実施例について説明する。なお、アミノ酸、アミノ酸残基、  
5 保護されたアミノ酸、アミノ保護基、ヒドロキシル保護基、活性基、等の表示は、IUPAC-IUB commission on Biological Nomenclatureに基づく略号、あるいは当該ペプチド合成分野における慣用略号により行う場合がある。

10 なお、以下の実施例中に用いた略号は次のとおりである。

Boc	: t-butyloxycarbonyl
Bzl	: benzyl
Tos	: p-toluenesulfonyl
15 Cbz	: 2-chlorobenzyloxycarbonyl
Cbz·Bzl	: 2,6-dichlorobenzyl
OCHex	: cyclohexyl ester
DCC	: N,N-dicyclohexyl carbodiimide
HOBT	: 1-hydroxy benzotriazole
20 NHS	: N-hydroxysuccinimide
MA法	: Mixed anhydride method
AE法	: active ester method
TLC	: thin layer chromatography
HPLC	: high performance liquid chromatography
25 TFA	: trifluoroacetic acid

- 7 -

NMM : N-methylmorpholine

IBC : iso-butylchloroformate

### 実施例 1

(a) 式(Ic)のペプチド、すなわちHd(1-33)-NH<sub>2</sub> の合  
成(固相法)

ベックマン社製ペプチド合成機Model 990Cの反応槽  
にアミノ酸又はペプチドの固定用の樹脂として、2.00  
g のベンズヒドリルアミン-ポリスチレン樹脂(アミ  
ノ基含有量 0.5mmol/g樹脂; (株)ペプチド研究所より  
購入)を添加し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>にて2時間攪拌し樹脂を膨潤  
させる。

次に、下記のステップ⑤からステップ⑩の手順によ  
り、ヘロデルミンの33位のアミノ酸であるプロリンの  
Boc保護誘導体である Boc-Pro-OHを前記の樹脂に反応  
させ且つ後処理する。

① CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20mlで既に生成された保護ペプチド-樹脂を  
3回洗浄。

② 30% TFAのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液20mlで保護ペプチド-樹脂を予  
備洗浄。

③ 30% TFAのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液 20mlで処理することにより、  
樹脂に結合されたペプチドのN末端アミノ酸のアミ  
ノ保護基を脱保護する。

④ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20mlで脱保護されたペプチド-樹脂を6回洗  
浄。

⑤ 7% N-メチルモルホリンのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液 20mlで脱保護

- 8 -

されたペプチド-樹脂を予備洗浄。

⑥ 7% N-メチルモルホリンのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液 20mlでペプチド-樹脂を中和。

⑦ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20mlで6回洗浄。

5 ⑧ 新らたに結合させるべきBoc保護アミノ酸3.0mmolとHOBT 3.0mmolをDMF 7ml及びCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 7ml混液に溶解した溶液を反応槽に添加。

⑨ 0.5M DCCのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液を6ml加えて2時間攪拌してBoc保護アミノ酸のカップリング反応を行う。

10 ⑩ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20mlで反応系を3回洗浄。

上記のステップ⑤からステップ⑩を行うことによって、先づ樹脂へのBoc-Pro-OHの導入が終了する。

以上の如くして導入されたC末端Pro残基より開始して、以後は所定の保護アミノ酸を順次に構築中のペプチド鎖に導入する。その各アミノ酸の縮合反応では、前記のステップ①より⑩を繰り返す。反応させる保護アミノ酸は下記の順序でいずれも3.0mmolの量で加える。また、各縮合反応では、ステップ⑨で加えるHOBTの量は3.0mmolである。但し、Hisは、その分子中のイミダゾール部分がHOBTによる変化を受けるため、最終N端のHisをカップリングさせるに当っては、HOBTを使用しない。次いで反応させるべき保護アミノ酸の添加順序は下記の通りである。

Boc-Ser(Bz)-OH, Boc-Thr(Bz)-OH,

25 Boc-Arg(Tos)-OH·4/5AcOEt·1/5H<sub>2</sub>O,

- 9 -

- Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Gly-OH,  
 Boc-Leu-OH·H<sub>2</sub>O, Boc-Ile-OH·1/2H<sub>2</sub>O,  
 Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Ala-OH,  
 Boc-Leu-OH·H<sub>2</sub>O, Boc-Tyr(C<sub>6</sub>Z-Bzl)-OH,  
 5 Boc-Lys(C<sub>6</sub>Z-Z)-OH, Boc-Gly-OH,  
 Boc-Leu-OH·H<sub>2</sub>O, Boc-Ala-OH, Boc-Leu-OH·H<sub>2</sub>O,  
 Boc-Lys(C<sub>6</sub>Z-Z)-OH, Boc-Ala-OH,  
 Boc-Leu-OH·H<sub>2</sub>O, Boc-Leu-OH·H<sub>2</sub>O,  
 Boc-Lys(C<sub>6</sub>Z-Z)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH,  
 10 Boc-Tyr(C<sub>6</sub>Z-Bzl)-OH, Boc-Gln-OH,  
 Boc-Gln-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Phe-OH,  
 Boc-Ile-OH·1/2H<sub>2</sub>O, Boc-Ala-OH,  
 Boc-Asp(OcHex)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH,  
 Boc-His(Tos)-OH  
 15 以上 の 操 作 に よ り 、 反 応 す べ き ア ミ ノ 酸 の 導 入 が す  
     べ て 終 了 す と 、 樹 脂 上 に 、 次 式 で 表 わ さ れ る 保 護 ペ  
     プ チ ド す な わ ち 保 護 さ れ た Hd(1-33) が 合 成 さ れ る。  
 Boc-His(Tos)-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Ala-Ile-Phe-  
 Thr(Bzl)-Gln-Gln-Tyr(C<sub>6</sub>Z-Bzl)-Ser(Bzl)-Lys(C<sub>6</sub>Z)  
 20 -Leu-Leu-Ala-Lys(C<sub>6</sub>Z)-Leu-Ala-Leu-Gln-Lys(C<sub>6</sub>Z)-  
 -Tyr(C<sub>6</sub>Z-Bzl)-Leu-Ala-Ser(Bzl)-Ile-Leu-Gln'-  
 Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Pro-NH-樹脂。  
 この 樹 脂 上 に 結 合 し た 保 譲 ペ プ チ ド 、 即 ち 保 譲 ペ プ  
 チ ド - 樹 脂 は デ シ ケ ー タ ー 中 で 一 夜 乾 燥 す る 。 乾 燥 し  
 25 た 保 譲 ペ プ チ ド - 樹 脂 の 内 2.0g を 取 り 、 ア ニ ソ ール 2.0

- 10 -

mLの存在下にフッ化水素20mLで0°C、1時間処理することにより、ペプチド鎖からの脱保護反応と樹脂からの脱保護されたペプチド生成物の解離とを行う。反応混合物からフッ化水素を留去し、残留物をエーテルで洗浄し、十分乾燥させた後、3M酢酸100mLと混合させこれにペプチド生成物を溶解させ、さらに不溶の樹脂を滤去する。ペプチド生成物を含む得られた滤液は凍結乾燥すると、892 mgの粗ペプチドが得られる。この粗ペプチドは、3M酢酸水溶液を溶出液とするSephadex G-25カラムクロマトグラフィー(3×140cm)によるゲル滤過で脱塩処理にかけ、続いて0.01N HCl/CH<sub>3</sub>CN系の溶媒で溶出するYMC Pack D-ODS-5カラム(2×25cm)による逆相クロマトグラフィーによりペプチドを精製した。このようにして得た精製ペプチドHd(1-33)-NH<sub>2</sub>は酸加水分解後に下記のアミノ酸分析値を示す。

Asp(1)0.98; Thr(2)1.91; Ser(5)4.55; Glu(3)3.01;  
Gly(1)1.09; Ala(4)3.74; Ile(2)1.89; Leu(6)6.03;  
Try(2)2.05; Phe(1)1.01; Lys(3)3.21; His(1)1.08;  
Arg(1)0.90; Pro(1)0.99

20 (b) 式(Ic)のペプチド、すなわちHd(1-33)-NH<sub>2</sub>の合成

(液相法)

Hd(1-33)の1-6位、7-9位、10-15位、16-20位、21-23位、および24-33位の各々のアミノ酸配列に相当する下記の(1)～(6)の6種のペプチドを常法に従い、活性エステル法又は混合酸無水物法等を用いて合成した。

- 11 -

ここで合成した各ペプチドは下記の通りである。

(1) Boc-His(Tos)-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Ala-Ile-Phe-OH

(2) Boc-Thr(Bzl)-Gln-Gln-OH

5 (3) Boc-Tyr(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-BzI)-Ser(Bzl)-Lys(C<sub>6</sub>-Z)-Leu-Leu-Ala-OH

(4) Boc-Lys(C<sub>6</sub>-Z)-Leu-Ala-Leu-Gln-OH

(5) Boc-Lys(C<sub>6</sub>-Z)-Tyr(C<sub>6</sub>-BzI)-Leu-OH

10 (6) Boc-Ala-Ser(Bzl)-Ile-Leu-Gly-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Pro-NH<sub>2</sub>

これらの6種のペプチドを、C末端より即ち(6)のペプチド(アミド化体)から始めて順次に活性エステル法によりフラグメント縮合法により縮合させて、保護Hd(1-33)-NH<sub>2</sub>を得た。保護Hd(1-33)-NH<sub>2</sub>をアニソールの存在下でフッ化水素中で処理することにより脱保護させる。得られた粗ペプチドHd(1-33)-NH<sub>2</sub>を、ゲル濾過クロマトグラフィー(セファデックスG-25)及び分取用逆相HPLC(Column: YMC Pack D-ODS-5)で精製すると、精製ペプチドHd(1-33)-NH<sub>2</sub>を得た。

## 20 実施例 2

### 式(Ib)のペプチド、すなわちHd(1-32)-NH<sub>2</sub>の合成

ベックマン社製ペプチド合成機Model 990Bを用い、固相法により実施例1と同様な要領で所定のアミノ酸を順次に縮合させてペプチド合成を行ない、ペプチドHd(1-32)-NH<sub>2</sub>を得た。また、液相法も実施例1と同様

- 12 -

に行い Hd(1-32)-NH<sub>2</sub>を得た。

得られたペプチド Hd(1-32)-NH<sub>2</sub>のアミノ酸分析（酸加水分解、6N HCl、110°C、24時間）を行って、下記のアミノ酸分析値を得た。

Asp(1)1.02; Thr(2)2.01; Ser(5)4.62; Glu(3)3.03;  
Gly(1)1.08; Ala(4)4.17; Ile(2)1.81; Leu(6)5.94;  
Try(2)1.91; Phe(1)1.03; Lys(3)3.30; His(1)1.04;  
Arg(1)0.98

### 実施例 3

#### 式(Ia)の本発明のペプチド、すなわち Hd(1-31)-NH<sub>2</sub>の合成

ベックマン社製ペプチド合成機 Model 990Cを用い、固相法により実施例1と同様な要領で所定のアミノ酸を順次に縮合させてペプチド合成を行ない、ペプチド Hd(1-31)-NH<sub>2</sub>を得た。また、液相法によるペプチド合成も実施例1と同様に行い、Hd(1-31)-NH<sub>2</sub>を得た。

得られたペプチドのアミノ酸分析（酸加水分解、6N HCl、110°C、24時間）を行って、下記のアミノ酸分析値を得た。

Asp(1)1.08; Thr(2)1.96; Ser(4)3.76; Glu(3)3.10;  
Gly(1)1.13; Ala(4)4.14; Ile(2)1.90; Leu(6)6.09;  
Tyr(2)1.97; Phe(1)1.09; Lys(3)2.97; His(1)0.98;  
Arg(1)0.84

### 実施例 4

#### 式(II)の本発明ペプチド、すなわち VIP(1-11)-Hd

- 13 -

(12-31)-NH<sub>2</sub> の合成(液相法)

ペプチドVIP(1-11)-Hd(12-31)-NH<sub>2</sub>の1-4位、5-9位、10-15位、16-20位、21-23位、24-31位の夫々のアミノ酸配列に相当する下記(1)~(6)の6種のペプチドを、  
 5 Stepwise elongation法により所定の Boc-アミノ酸を順次に結合することで合成した。各Boc-アミノ酸の縮合反応は、活性エステル法(AE法)または混合酸無水物法(MA法)を用いて行った。ここで合成した上記6種のペプチドはそれぞれ下記の通りであり、下記の手法により合成された。

- (1) Boc-His(Tos)-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Ala-OH
- (2) Boc-Val-Phe-Thr(Bzl)-Asp(OcHex)-Asn-OH
- (3) Boc-Tyr(C<sub>6</sub>-Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(C<sub>6</sub>-Z)-Leu-Leu-Ala-OH
- (4) Boc-Lys(C<sub>6</sub>-Z)-Leu-Ala-Leu-Gln-OH
- (5) Boc-Lys(C<sub>6</sub>-Z)-Tyr(C<sub>6</sub>-Bzl)-Leu-OH
- (6) Boc-Ala-Ser(Bzl)-Ile-Leu-Gly-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-NH<sub>2</sub>

(1) Boc-His(Tos)-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Ala-OH の合成

Boc-Asp(OcHex)-OH(分子量315.37)9.46gとNHS(分子量115.09)3.80gとを縮合剤としてDCCの存在下に縮合し、アミノ酸活性エステル(I)としてBoc-Asp(OcHex)-ONHSの14.05g(收率85.02%)を得た。アミノ酸活性エステル(I)の4.53gとH-Ala-OH(分子量89.11)6.98gを

- 14 -

活性エステル法(AE法)により縮合すると、ペプチド(II)として Boc-Asp(OcHex)-Ala-OH(分子量386.44) 3.26g(収率76.8%)を得た。ペプチド(II)の2.00gをTFA処理により脱Boc化した後、得られたペプチド、すなわちAsp(OcHex)-Ala-OHをBoc-Ser(Bzl)-OH(分子量295.33)1.84gと混合酸無水物法(MA法)により縮合させると、ペプチド(III)としてBoc-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Ala-OH(分子量563.65)2.54g(収率87.1%)を得た。ペプチド(III)の1.17gをTFA処理により脱Boc化した後、得られたペプチドを Boc-His(Tos)-OH 1.10gとMA法により縮合すると、ペプチド(IV)として Boc-His(Tos)-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Ala-OH(分子量854.98)の 940mg(収率53.0%)を得た。

(2) Boc-Val-Phe-Thr(Bzl)-Asp(OcHex)-Asn-OHの合成

Boc-Asp(OcHex)-ONHSの6.19gとH-Asp-OHの1.98gをAE法により縮合させると、ペプチド(V)としてBoc-Asp(OcHex)-Asn-OHの4.10g(収率63.6%)を得た。ペプチド(V)の3.87gをTFA処理により脱Boc化した後、得られたペプチドを Boc-Thr(Bzl)-OHとMA法により縮合すると、ペプチド(VI)としてBoc-Thr(Bzl)-Asp(OcHex)-Asn-OHの3.70g(収率66.2%)を得た。ペプチド(VI)の3.70gをTFA処理により脱Boc化した後、得られたペプチドを Boc-Phe-OH 2.21gとMA法により縮合させると、ペプチド(VII)としてBoc-Phe-Thr(Bzl)-Asp(OcHex)-Asn-OH 4.04g(収率88.3%)を得た。ペプチド(VII)の

- 15 -

1.15gをTFA処理により脱Boc化した後、得られたペプチドをBoc-Val-OH 0.39gとMA法により縮合させると、ペプチド(VII)としてBoc-Val-Phe-Thr(Bz1)-Asp(OcHex)-Asn-OH 0.78g(収率60.0%)を得た。

5       (3) Boc-Tyr(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>·Bz1)-Thr(Bz1)-Lys(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>·Z)-Leu-Ala-  
OHの合成

Boc-Leu-OH 11.56gとNHS 5.75gを縮合剤としてDCCの存在下に縮合し、アミノ酸活性エステル(VIII)としてBoc-Leu-ONHS 12.31g(収率75.0%)を得た。この活性エステル(VIII)の9.85gをH-Ala-OH 2.67gとAE法により縮合し、ペプチド(X)としてBoc-Leu-Ala-OH 8.12g(収率89.3%)を得た。ペプチド(X)の4.0gをTFA処理により脱Boc化した後、得られたペプチドをBoc-Leu-OH 4.88gとMA法により縮合させると、ペプチド(XI)としてBoc-Leu-Leu-Ala-OH 3.72g(収率67.7g)を得た。ペプチド(XI)の2.50gをTFA処理により脱Boc化した後、得られたペプチドをBoc-Lys(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>·Z)-OH 3.61gとMA法により縮合し、ペプチド(XII)、Boc-Lys(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>·Z)-Leu-Leu-Ala-OH 4.87g(94.0%)を得た。ペプチド(XII)の2.35gをTFA処理により脱Boc化した後、得られたペプチドをBoc-Thr(Bz1)-OH 1.36gとMA法により縮合すると、ペプチド(XIII)、Boc-Thr(Bz1)-Lys(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>·Z)-Leu-Leu-Ala-OH 2.15g(収率72.1%)を得た。このペプチド(XIII)の2.20gをTFA処理により脱Boc化した後、その脱Boc体をBoc-Tyr(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>·Bz1)-OH 1.40gとMA法により縮合させ

- 16 -

ると、ペプチド(X IV)、Boc-Tyr(Cl<sub>2</sub>-Bz1)-Thr(Bz1)-Lys(Cl-Z)-Leu-Leu-Ala-OH 2.98g(収率 99.8%)を得た。

(4) Boc-Lys(Cl-Z)-Leu-Ala-Leu-Gln-OHの合成

5 Boc-Leu-ONHS 3.28gとH-Gln-OH 1.46gをAE法により縮合させると、ペプチド(X V)、Boc-Leu-Gln-OH 2.48g(収率69.1%)を得た。ペプチド(X V)の3.10%をTFA処理により脱Boc化後、得られたペプチドをBoc-Ala-OH 2.12gとHA法により縮合すると、ペプチド  
10 (X VI)、Boc-Ala-Leu-Gln-OH 1.93g(収率52.0%)を得た。ペプチド(X VI)の900mgをTFA処理により脱Boc化後、得られたペプチドをBoc-Leu-OH 680mgとHA法により縮合すると、ペプチド(X VII)、Boc-Leu-Ala-Leu-Gln-OH 710mg(収率62.5%)を得た。ペプチド(X VII)の670mgをTFA処理により脱Boc化した後、得られたペプチドをBoc-Lys(Cl-Z)-OH 660mgとMA法により縮合させる。ペプチド(X VIII)、Boc-Lys(Cl-Z)-Leu-Ala-Leu-Gln-OH 850mg(82.1%)を得た。

(5) Boc-Lys(Cl-Z)-Tyr(Cl<sub>2</sub>-Bz1)-Leu-OHの合成

20 Boc-Tyr(Cl<sub>2</sub>-Bz)-OH 22.12gとNHS 6.33gを縮合剤としてDCCの存在下に縮合し、ペプチド(X IX)、Boc-Tyr(Cl<sub>2</sub>-Bz1)-ONHS 15.84g(収率58.7%)を得た。ペプチド(X IX)の5.39gとH-Leu-OH 1.31gを、AE法により縮合じ、ペプチド(X X)、Boc-Tyr(Cl<sub>2</sub>-Bz1)-Leu-OH 3.93g(収率71.1%)を得た。ペプチド(X X)の2.33g

- 17 -

を TFA 处理により脱 Boc 化後、得られたペプチドを Boc-Lys(C<sub>1</sub>·Z)-OH 2.09g と MA 法により縮合させる。ペプチド (X XII)、Boc-Lys(C<sub>1</sub>·Z)-Tyr(C<sub>12</sub>·Bz1)-Leu-OH 2.56g (収率 71.7%) を得た。

5      (6) Boc-Ala-Ser(Bz1)-Ile-Leu-Gly-Ser(Bz1)-Arg(Tos)-Thr-NH<sub>2</sub> の合成

保護されたアミノ酸として Boc-Thr(Bz1)-OH 6.19g に NMM 及び IBC を夫々に当量の割合で加え、混合酸無水物をつくり、そこへ、NHS 2.53g を反応させアミノ酸活性エステルに変換する。次いで、NH<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O を 10 倍量加え、アミド化反応を行うと、アミノ酸のアミド化生成物 (X XIII)、Boc-Thr(Bz1)-NH<sub>2</sub> 3.69g (収率 59.8%) を得た。この生成物 (X XIII) の 2.00g を TFA 处理により脱 Boc 化後、得られた Thr(Bz1)-NH<sub>2</sub> を Boc-Arg(Tos)-OH 3.06g と MA 法により縮合させると、ペプチド (X X III)、Boc-Arg(Tos)-Thr(Bz1)-OH 3.12g (77.6%) を得た。ペプチド (X X III) の 2.16g を TFA 处理により脱 Boc 化後、得られた Arg(Tos)-Thr(Bz1)-OH を Boc-Ser(Bz1)-OH 1.13g と MA 法により縮合させると、ペプチド (X X IV)、Boc-Ser(Bz1)-Arg(Tos)-Thr(Bz1)-NH<sub>2</sub> 2.29g (収率 82.2%) を得た。ペプチド (X X IV) の 2.00g を TFA 处理により脱 Boc 化後、その脱 Boc 生成物を Boc-Leu-Gly-OH 0.87g と MA 法により縮合し、ペプチド (X X V)、Boc-Leu-Gly-Ser(Bz1))-Arg(Tos)-Thr(Bz1)-NH<sub>2</sub> 2.19g (収率 90.7%) を得た。前記の Boc-Leu-Gly-OH は、Boc-Leu

- 18 -

-ONHSとH-Gly-OHをAE法により縮合して収率78.7%で得られたものである。

次にペプチド(X XV)の2.00gをTFA処理して脱Boc後、その脱Boc生成物をBoc-Ile-OH 0.72gとMA法により縮合し、ペプチド(X XVI)、Boc-Ile-Leu-Gly-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-NH<sub>2</sub> 1.99g(収率89.1%)を得た。ペプチド(X XVI)の830mgをTFA処理により脱Boc化後、得られた脱Boc生成物をBoc-Ser(Bzl)-OH 270mgとMA法により縮合させると、ペプチド(X XVII)、Boc-Ser(Bzl)-Ile-Leu-Gly-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-NH<sub>2</sub> 630mg(収率66.8%)を得た。ペプチド(X XVII)の630mgをTFA処理により脱Boc化後、その脱Boc生成物をBoc-Ala-OH 110mgとMA法により縮合させると、ペプチド(X XVIII)、Boc-Ala-Ser(Bzl)-Ile-Leu-Gly-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-NH<sub>2</sub> 570mg(収率85.9%)を得た。

(7) 保護されたペプチドVIP(1-11)-Hd(12-31)-NH<sub>2</sub> の合成

前項(6)で得られたペプチド(X XVIII)900mgをTFA処理により脱Boc化後、その得られた脱Boc生成物を、前項(5)で得られたペプチド(X XI)の693mgとDCC-HOBt法により縮合反応させた。常法に従いその縮合生成物を後処理し、メタノールで洗浄し、ペプチド(X XIX)、Boc-Lys(Cl<sub>2</sub>Z)-Tyr(Cl<sub>2</sub>Z-Bzl)-Leu-Ala-Ser(Bzl)-Ile-Leu-Gly-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-NH<sub>2</sub> 1.22g(収率85.9%)を得た。

- 19 -

率 87.4 % ) を得た。ペプチド(XXIX)の 1.00g を TFA 処理により脱 Boc 化後、その脱 Boc 生成物を、前項(4)で得たペプチド(XVII)の 490mg と DCC-HOBt 法により、フラグメント縮合し、得られた粗製の縮合生成物を DMF に溶解後、その溶液から AcOEt / エーテル(1/4) の添加によりペプチド生成物を再沈澱させると、ペプチド(XXX)として、Boc-Lys(Cl<sub>1</sub>·Z)-Leu-Ala-Leu-Gln-Lys(Cl<sub>1</sub>·Z)-Tyr(Cl<sub>2</sub>·Bz1)-Leu-Ala-Ser(Bz1)Ile-Leu-Gly-Ser(Bz1)-Arg(Tos)-Thr(Bz1)-NH<sub>2</sub> 1.16g (収率 85.9 %) を得た。

このペプチド(XXX)の 1.00g を TFA 处理により脱 Boc 化後、得られた脱 Boc 生成物を、前項(3)で得られたペプチド(XIV)の 662mg と、DCC-HOBt 法により、フラグメント縮合した。得られた粗製の縮合生成物を上述した方法と同様に後処理し、ペプチド(XXXI)として Boc-Tyr(Cl<sub>2</sub>·Bz1)-Thr(Bz1)-Lys(Cl<sub>1</sub>·Z)-Leu-Leu-Ala-Lys(Cl<sub>1</sub>·Z)-Leu-Ala-Leu-Gln-Lys(Cl<sub>1</sub>·Z)-Tyr(Cl<sub>2</sub>·Bz1)-Leu-Ala-Ser(Bz1)-Ile-Leu-Gly-Ser(Bz1)-Arg(Tos)-Thr(Bz1)-NH<sub>2</sub> 1.39g (収率 99.4 %) を得た。このペプチド(XXXI)の 600mg を TFA 处理により脱 Boc 化後、その脱 Boc 生成物を、前項(2)で得られたペプチド(VIII)の 195mg と DCC-HOBt 法により、フラグメント縮合した。得られた粗製の縮合生成物を、上述した方法と同様に後処理し、ペプチド(XXXII)として Boc-Val-Phe-Thr(Bz1)-Asp(OcHex)-Asn-Tyr(Cl<sub>2</sub>·Bz1)-Thr(Bz1)-

- 20 -

Lys(Cl·Z)-Leu-Leu-Ala-Lys(Cl·Z)-Leu-Ala-Leu-Gln-Lys(Cl·Z)-Tyr(Cl<sub>2</sub>·Bzl)-Leu-Ala-Ser(Bzl)-Ile-Leu-Gly-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-NH<sub>2</sub> の 530mg(収率 74.1%)を得た。このペプチド(XXXII)の 400mgを  
5 TFA処理により脱 Boc化後、得られた脱Boc生成物を前項(1)で得られたペプチド(IV)の 147mgと DCC-HOBt 法により、フラグメント縮合させると、保護されたVIP(1-11)-Hd(12-31)-NH<sub>2</sub> 370mg(収率 79.8%)を得た。

(8) VIP(1-11)-Hd(12-31)-NH<sub>2</sub> の合成

10 前項(7)で得られた保護されたVIP(1-11)-Hd(12-31)-NH<sub>2</sub> の 200mgを無水フッ化水素-アニソール(10 : 1)の混液の 5mlに溶解させた後に、その溶液を 0℃、60 分間攪拌して脱保護反応を行った。その反応液を常法に従い後処理した後、3M-酢酸で抽出した。抽出液を  
15 凍結乾燥し、得られた粗生成物をゲルfiltration クロマトグラフィー(セファデックスG-25) 及び逆相HPLC(YMC Pack D-ODS-5、溶出液：0.01N塩酸-アセトニトリル混合液)により精製し、VIP(1-11)-Hd(12-31)-NH<sub>2</sub> すなわち式(II)の本発明ペプチドの 18mgを得た。

20 この得られたペプチドをアミノ酸分析(酸加水分解、6N HCl、110℃、24時間)すると、下記のアミノ酸分析値を示した。

Asp(3)2.88; Thr(3)2.92; Ser(3)2.78; Glu(1)1.05;  
25 Gly(1)1.07; Ala(4)4.21; Val(1)0.97; Ile(1)1.02;  
Leu(6)6.13; Tyr(2)2.08; Phe(1)0.95; Lys(3)3.05;

- 21 -

His(1)1.01; Arg(1)0.95

このペプチドをHPLCによる分析にかけると、溶出時間 14.9分であった。この際のHPLCの条件はカラムYMC Pack R-ODS-5(0.46×25cm) を用い、溶出液は0.01N塩酸／アセトニトリル(80/20)→(50/50)であり、グラジエント時間は30分とした。検出器ではUV(210nm) の波長の吸光度で検出し、被検液は流量 1.0ml/min. で流した。

#### 実施例 5

式(Ⅱ)の本発明ペプチド、すなわちVIP(1-11)-Hd(12-31)-NH<sub>2</sub> の合成(固相法)

ベックマン社製ペプチド合成機Model 990Cを用い、固相法により実施例1と同様な要領で所定のアミノ酸を順次に縮合させてペプチド合成を行ない、ペプチド VIP(1-11)-Hd(12-31)-NH<sub>2</sub>を得た。

#### 実施例 6

式(Ⅲ)の本発明ペプチド、すなわちVIP(1-28)-Hd(29-35)-NH<sub>2</sub> の合成(固相法)

本実施例においては、35個のアミノ酸基からなるペプチドVIP(1-28)-Hd(29-35)-NH<sub>2</sub> の合成は、自動ペプチド合成機[Beckman社製自動ペプチド合成機Model 990B]を用い、固相法により、所定のアミノ酸を順次に縮合させることによりペプチド鎖を延長して行った。

合成中のペプチドの固相担体として

p-methylbenzhydrylamine-樹脂(1% divinylbenzen

- 22 -

-polystyrene共重合体) (-NH<sub>2</sub>含量; 0.3mmol/g樹脂、  
2.0g) (国産化学社製)を自動ペプチド合成機の反応槽  
に装入した。

縮合される各アミノ酸のα位アミノ基のアミノ保護  
5 基は、t-butyloxycarbonyl(Boc基)であり、原料として  
使用されるBoc-アミノ酸はいずれもペプチド研究所  
(大阪)より購入した。

そのBoc-アミノ酸のうち、側鎖に官能基を有する  
アミノ酸であるArg, Asp, His, Lys, Ser, Thrおよび  
10 Tyrは下記の保護アミノ酸の形で用いた。

Boc-Arg(Tos)-OH, Boc-Asp(OcHex), Boc-His(Tos)-OH,  
Boc-Lys(ε-2-C<sub>6</sub>-Z)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Thr  
(Bzl)-OH, Boc-Tyr(2,6-C<sub>6</sub>-Bzl)-OH

上記のアミノ酸の側鎖官能基に結合された保護基は  
15 いずれもアミノ酸の縮合反応中で安定であるが、ペプ  
チド鎖の完成後には液体フッ化水素処理により脱離で  
きる。

各アミノ酸の縮合後には、ペプチドのN末端のアミ  
ノ保護基Boc基は脱離されるが、このための脱Boc化試  
20 薬であるトリフルオロ酢酸(TFA)は、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中50%TFA  
溶液(50%TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)として使用した。

脱Boc化反応の後、ペプチド末端に生成するアミ  
ノ基TFA塩の中和剤としてN,N-diisopropylethylamine  
(DIEA)を10%DIEA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液の形で使用した。

25 アミノ酸の縮合のための縮合試薬として

- 23 -

dicyclohexylcarbodiimide (DCC)、および縮合反応触媒として1-hydroxybenzotriazole (HOBT) を使用した。

なお、本実施例で用いた溶媒および試薬は、いずれも試薬特級またはペプチド合成用試薬を用いた。

5 各アミノ酸の縮合反応を行うに当っては、カイザー試験によりその進行度を調べた。すなわち、すでに形成されたペプチド鎖への各Boc-アミノ酸の縮合反応後、生成した保護ペプチド-樹脂の約 0.01gを反応槽から試験管に取り出し、以下の試薬(1)、(2)および(3)の溶液をそれぞれ 3 滴加え、2.5分、110℃で加熱した。

ニンヒドリン陽性を示した場合には、縮合反応を再度行った。

(1) フェノール 4mg/mlエタノール溶液

(2) 1mM KCN 2mlをピリジン100mlで希釀した溶液

15 (3) ニンヒドリン50mg/mlエタノール溶液

以下に本実施例で行った反応工程を具体的に記載する。

#### (1) 保護ペプチド-樹脂の合成

p-Methylbenzhydrylamine-樹脂 (-NH<sub>2</sub> 含量; 0.3mmol/g樹脂) 2.0g (0.6mmol) をペプチド自動合成機の反応槽に添加、DMF 45ml 中で 24 時間、ついで CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 45ml 中で 24 時間攪拌し、樹脂を膨潤させたのち、所定のBoc-アミノ酸を順次に用い縮合反応を行った。

25 Boc-アミノ酸 1 個を導入するのに必要な操作は、樹脂上すでに形成されたペプチドの N-末端からの脱

- 24 -

Boc化、中和、Boc-アミノ酸の縮合の過程からなる。

これらすべての操作は乾燥窒素気流中で行った。各操作は、次のように行った。

① 保護ペプチド-樹脂を反応槽に入れ、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 40

5 mlを注入、その混合物を1.5分間攪拌し濾過した。この操作を3回繰り返した。

② 50% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 40mlと共に保護ペプチド-樹脂を1.5分間攪拌し、洗浄および樹脂との平衡化を行い濾過した。

10 ③ 50% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 40mlと共に保護ペプチド-樹脂を30分攪拌しペプチドのN末端から脱Boc化し、濾過した。

15 ④ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 40mlと共に保護ペプチド-樹脂を1.5分間攪拌したのち、濾過した。この操作を6回繰り返し、ペプチド-樹脂上に残留するTFAを洗浄により除去した。

20 ⑤ 10% DIEA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 40mlを反応槽に注入、ペプチド-樹脂と共に1.5分間攪拌したのち、濾過した。この操作を3回繰り返し、ペプチド中のTFA塩を中和した。

⑥ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 40mlを注入、ペプチド-樹脂と共に1.5分間攪拌し、濾過した。この操作を6回繰り返し、残留するDIEAを除去した。

25 ⑦ 所定のBoc-アミノ酸およびHOBrのそれぞれ3倍当量(0.6mmol)をDMF 5mlとCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 10mlに溶解した溶

- 25 -

液を、反応槽に添加、5分間攪拌して樹脂との平衡化を行った。

⑧ 0.5M DCC/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3.6mL(1.8mmol)を加え、反応槽内で室温で120分間攪拌し、Boc-アミノ酸の縮合反応を行ったのち、濾過した。

⑨ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 40mLを生成されたペプチド-樹脂に加え1.5分間攪拌し、濾過した。この操作を6回繰り返し、残留した反応試薬を洗浄、除去した。

上記一連の操作が完了した後、さらに、DMF 40mL、MeOH 40mL、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 40mLの順でそれぞれ3回ずつ5分間攪拌し、保護ペプチド-樹脂を洗浄した。これを濾取し、得られた樹脂についてカイザー試験を行った。ニンヒドリン陽性を示した場合には、上記⑦～⑨の操作を再度行い、ペプチド鎖へのアミノ酸の縮合反応を完結させた。

上記の要領で順次に各Boc-アミノ酸を導入することにより、ペプチド鎖を延長させて行くと、VIP(1-28)-Hd(29-35)-NH<sub>2</sub>に相当するペプチドを含む保護ペプチドが樹脂上に結合した状態で生成された。この保護ペプチド-樹脂を反応槽から取り出し、DMF 40mL、MeOH 40mLおよびCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 40mLにて、それぞれ3回ずつ洗浄したのち、濾取し、乾燥剤P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>を収容するデシケーター中で減圧乾燥すると、保護ペプチド-樹脂 2.54gを得た。

25 (2) 保護ペプチド-樹脂の液体フッ化水素処理

- 26 -

前項(1)で得られたVIP(1-28)-Hd(29-35)-NH<sub>2</sub>に相当する保護ペプチドを結合した樹脂(1.27g)をテフロン被膜攪拌子とともにHF反応容器(ペプチド研究所、大阪)に入れ、アニソール(1.5ml)およびエチルメチルスルフィド(0.5ml)を加えて室温で減圧下で30分間放置した。反応槽をドライアイス-アセトン浴で冷却下、に再蒸留したフッ化水素(15ml)を前記の保護ペプチド-樹脂とアニソールとエチルメチルスルフィドとの混合物に対して添加、0℃で60分間攪拌し、ペプチドを樹脂から解離すると共に側鎖官能基の保護基も保護ペプチド鎖から脱離した。反応混合物からHFを留去したのち、固体残留物を酢酸エチル(30ml)で3回洗浄し、濾取した。固体残留物を減圧乾燥し、これを0.02%エタンチオール含有3M酢酸(100ml)にて抽出して粗ペプチドを含む抽出液を得た。樹脂を濾過により除き、濾液を凍結乾燥し、粗ペプチド生成物455mgを得た。

### (3) 粗ペプチド生成物の検定

前項(2)で得られた粗ペプチド生成物の純度は、逆相HPLCにより検討した。分析用逆相HPLC用機器としては、高速液体クロマトグラフ装置(TOSOH CCPD、東ソー社製)、低圧グラジエント装置GE-8000(東ソー社製)、紫外可視分光検出器UV-model II(東ソー社製)およびフラットペンレコーダーType 3066(横河電機社製)を用い、溶出用カラムとしてYMC-Pack R-ODS-5(0.46×25cm)(ワイエムシイ社製)を用いた。溶出条件は、30分

間、流速 $1.0\text{mL}/\text{分}$ で $0.01\text{N HCl}/\text{CH}_3\text{CN}$ の比を $80/20$ から $50/50$ まで変化させ、UV吸光度( $210\text{nm}$ )で検索した。

粗ペプチドの主要溶出ピークを分取し、 $6\text{N HCl}$ による酸加水分解物のアミノ酸分析を行った結果、得られたペプチドが目的とする VIP(1-28)-Hd(29-35)-NH<sub>2</sub> のアミノ酸組成に一致することがわかった。  
5

#### (4) 粗ペプチド生成物の精製

前項(3)で得られた粗ペプチド生成物を逆相HPLCにより精製した。精製に使用した分取用逆相HPLC用機器には、高速液体クロマトグラフ装置 LKB 2249 LC Gradient Pump(Pharmacia LKB社製、Sweden)、紫外可視分光検出器LKB 2251 (Pharmacia LKB社製、Sweden) およびペンレコーダーLKB 2210 (Pharmacia LKB社製、Sweden) が含まれる。溶出用カラムは分取用YMC-Pack 10 D-ODS-5( $2.0 \times 25\text{cm}$ )(ワイエムシィ社製)を用いた。粗ペプチド生成物( $50\text{mg}$ )を $50\%$ 酢酸に溶解した溶液をカラムに添加し、 $0.01\text{N HCl}/\text{CH}_3\text{CN}$ 、流速 $10\text{mL}/\text{分}$ で溶出させた。溶出物は、UV吸光度( $210\text{nm}$ )により検索し、目的とするポリペプチドを含む画分を分取した。この 15 画分を凍結乾燥し、目的とする精製ポリペプチドの $8.5\text{mg}$ を得た。収率は、粗ペプチド生成物から計算して $17\%$ であった。  
15

#### (5) 精製ペプチドのアミノ酸分析

前項(4)で得られた精製ペプチド( $80\text{ }\mu\text{g}$ )を、硬質ガラス管中でフェノール含有 $6\text{N HCl } 0.3\text{mL}$ の存在下、脱 20

- 28 -

5 気封管し、110°C、24時間加水分解したのち、開管し、更に沸騰水浴上で減圧下にその反応液から6N HClを留去した。得られたペプチド酸加水分解物を、Lithium citrate buffer (Beckman社製)(500 μl)に溶解し、自動アミノ酸分析装置(Beckman社製、モデル7300)によりアミノ酸分析に供した。得られたアミノ酸分析値は下記に示す通りでありVIP(1-28)-Hd(29-35)-NH<sub>2</sub> のアミノ酸組成に一致した。

10 Asp(5)5.05; Thr(3)2.91; Ser(4)4.03; Glu(1)1.28;  
Pro(3)3.31; Ala(2)2.03; Val(2)1.59; Met(1)0.99;  
Ile(1)0.99; Leu(3)3.06; Tyr(2)1.87; Phe(1)0.80;  
Lys(3)3.10; His(1)0.99; Arg(3)3.00

#### (6) TLCのRf値および比旋光度の測定

15 シリカゲルTLCにおいて、展開溶媒(A)として1-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 5) を用いた場合の前項(5)の精製ペプチドのRf値は0.00であり、また展開溶媒(B)として1-BuOH-Pyridine-AcOH-H<sub>2</sub>O(30 : 20 : 6 : 24)、(upper phase) を用いた場合のRf値は0.20であった。

20 また、本ペプチドの比旋光度は、[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -85° (c 0.1、1M 酢酸)であった。

更に、前記の実施例1で合成された式(I c)の本発明ペプチド[Hd(1-33)-NH<sub>2</sub>]、実施例3で合成された式(I a)の本発明ペプチド[Hd(1-31)-NH<sub>2</sub>]及び実施例4で合成された式(II)の本発明ペプチド[VIP(1-11)-Hd(12-31)-NH<sub>2</sub>]のシリカゲルTLCにおけるRf値を、上記

- 29 -

と同様に2種の展開溶媒(A)及び(B)を用いて測定した。また、それらペプチドの比旋光度も測定した。測定結果を次表に示す。

5 本発明ペプチド	Rf値 (TLC, シリカゲル)		比旋光度
	Rf <sup>I</sup>	Rf <sup>II</sup>	
Hd(1-33)-NH <sub>2</sub>	0.02	0.29	
Hd(1-31)-NH <sub>2</sub>	0.01	0.38	
10 VIP(1-11)-Hd(12-31)-NH <sub>2</sub>	0.13	0.45	$[\alpha]_D^{25} -71^\circ$ (c 0.1, 1M酢酸)

Rf<sup>I</sup>: 展開溶媒(A)で展開した時のRf値、

Rf<sup>II</sup>: 展開溶媒(B)で展開した時のRf値、

次に本発明の新規ペプチドの生理活性を下記の通り試験した。

#### 試験例

##### 本発明ペプチドのイヌ大腿動脈血流に及ぼす影響

SaidとMuttによるVIP bioassay法〔Nature〕225, 863-864(1970)参照]に準じて行った。体重10kgのビーグル成犬3頭を18時間絶食後、チアミラール(10mg/kg)及びネンブタール(25ml/kg)にて麻酔した。実験中には、生理食塩水を静脈内に持続注入(2ml/分)し、電気加温器にて体温を37~38℃に保った。大腿動脈を剥離し、その動脈の筋肉枝にヘパリン添加生理食塩水を

- 30 -

満たしたポリエチレンチューブを挿入固定し、供試ペプチドの注入路とした。この筋肉枝の抹梢側の大膜動脈に電磁血流計のプローブを装着し、該動脈中の平均血流量を経時変化としてポリグラフに記録した。

5 供試ペプチド $10\ \mu\text{g}$ を $0.01\text{N}\ \text{HCl}$   $25\ \mu\text{l}$ に溶解した溶液を生理食塩水で希釈して調製したペプチドの注射液を、ペリスタルティクポンプにて動脈内に注入した。各ペプチドは  $200\text{pmol/kg}$  の投与量で注入した。供試ペプチドは次の化合物である。

10 化合物 1 : Hd(1-33)-NH<sub>2</sub> [本発明の式(Ic)のペプチド]

化合物 2 : Hd(1-31)-NH<sub>2</sub> [本発明の式(Ia)のペプチド]

15 化合物 3 : VIP(1-28)-Hd(29-35)-NH<sub>2</sub> [本発明の式(III)のペプチド]

化合物 4 : VIP(1-11)-Hd(12-31)-NH<sub>2</sub> [本発明の式(II)のペプチド]

対照化合物 : ヘロデルミン

20 供試ペプチドの注入から 0.5分、1分、2分、3分及び4分経過後の血流量を測定し、基礎血流量に比較しての血流量増加分( $\text{ml}/\text{分}$ )を算定して、その結果を下記の表1及び表2に示す。なお、表1の試験結果と表2の試験結果は、同一の方法で但し相異なる時期に行われた試験で得られたものである。

- 31 -

表 1

	初発の基礎血流量に比べての大腿動脈血流量の増加分 (ml/分)				
経過時間(分)	0.5	1	2	3	4
化合物 1	110	130	86	75	73
化合物 2	185	112	41	40	44
ヘロデルミン(対照)	80	115	77	68	65

10

表 2

	初発の基礎血流量に比べての大腿動脈血流量の増加分 (ml/分)				
経過時間(分)	0.5	1	2	3	4
化合物 3	274	171	146	136	109
化合物 4	271	99	75	65	62
ヘロデルミン(対照)	266	123	79	74	25

20

表 1 及び表 2 の結果から、上記の化合物 1、2、3、4、従って本発明の新規ペプチドはヘロデルミンに比べて増強された血流量増加効果とその血流量増加効果の持続効果とをもつことが分かった。

#### 産業上の利用可能性

25

以上のように、本発明により、血管平滑筋を弛緩さ

- 32 -

せて血流量を増加する作用を有する新たなペプチドが  
提供された。

5

10

15

20

25

- 33 -

### 請求の範囲

#### 1. 次の一般式(Ⅰ)

H-His-Ser-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Gln-Gln-Tyr-Ser-Lys

-Leu-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Leu-Gln-Lys-Tyr-Leu-Ala- (I)

5 Ser-Ile-Leu-Gly-Ser-Arg-Thr-X-NH<sub>2</sub>

(式中、Xは結合手ー、もしくはSer又はSer-Proを示す)で表わされるペプチド。

#### 2. 次式(Ⅱ)

H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Lys

10 -Leu-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Leu-Gln-Lys-Tyr-Leu-Ala- (II)

Ser-Ile-Leu-Gly-Ser-Arg-Thr-NH<sub>2</sub>

で表わされるペプチド。

#### 3. 次式(Ⅲ)

H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg

15 -Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn- (III)

Ser-Ile-Leu-Asn-Ser-Arg-Thr-Ser-Pro-Pro-Pro-NH<sub>2</sub>

で表わされるペプチド。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP90/01384

## I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl<sup>5</sup> C07K7/10, A61K37/02

## II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>

Classification System	Classification Symbols
IPC	C07K7/10, A61K37/02
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>	

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup>

Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	Eur. J. Biochem., Vol. 183, No. 2 (1989) Jacques Abello, et al. [Properties of vasoactive intestinal peptide receptors and beta-adrenoceptors in the murine radiation leukemia-virus-induced lymphoma cell line BL/VL 3] pp. 263-267	1-3
X	Colloq. INSERM, 174 (Forum Pept., 2nd, 1988) (1989) P. Gourlet, et al. [Presence of a new subclass of VIP receptors in human SUP-T1 lymphoblasts] pp. 151-154	1-3
X	FEBS Lett., Vol. 228, No. 2 (1988) Patrick Robberecht, et al. [A new type of functional VIP receptor has an affinity for helodermin in human SUP-T1 lymphoblasts] pp. 351-355	1-3
X	Peptides (Fayetteville, N.Y.), 7 (Suppl. 1) (1986) Patrick Robberecht, et al. [Interaction of synthetic amino- and carboxy-terminal fragments of helodermin with rat liver VIP receptors] pp. 79-82	1-3

\* Special categories of cited documents: <sup>10</sup>

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"a" document member of the same patent family

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search  January 5, 1991 (05. 01. 91)	Date of Mailing of this International Search Report  January 21, 1991 (21. 01. 91)
International Searching Authority  Japanese Patent Office	Signature of Authorized Officer

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

X	Peptides (Fayetteville, N.Y.), 7 (Suppl. 1) (1986) S. Naruse, et al. [Helodermin has a VIP-like effect upon canine blood flow] pp. 237-240	1-3
X	JP, A, 61-118399 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), June 5, 1986 (05. 06. 86), Pages 1, 2 (Family: none)	1-3

V.  OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE \*

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1.  Claim numbers , because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2.  Claim numbers , because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claim numbers , because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI.  OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING \*

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.PCT/EP 90/01807

SA 42137

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 31/01/91.  
The European Patent office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A2- 0110294	13/06/84	DE-A-C- 3243358	24/05/84
EP-A2- 0293159	30/11/88	JP-A- 63316800 US-A- 4771124	26/12/88 13/09/88

For more details about this annex : see Official Journal of the European patent Office, No. 12/82

EPO FORM P0479

BEST AVAILABLE COPY

## 国際調査報告

国際出願番号PCT/JP 90/01384

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>5</sup> C07K7/10, A61K37/02		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C07K7/10, A61K37/02	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
X	Eur. J. Biochem., 第183巻, 第2号(1989) Jacques Abello, et. al   Properties of vasoactive intestinal peptide receptors and beta-adrenoceptors in the murine radiation leukemia - virus - induced lymphoma cell line BL/VL3   pp. 263-267	1-3
X	Colloq. INSERM, 174 ( Forum Pept., 2nd, 1988 ) ( 1989 ) P. Gourlet, et. al [ Presence of a new subclass of VIP receptors in human SUP-T1 lymphoblasts ] pp. 151-154	1-3
X	FEBS Lett., 第228巻, 第2号(1988) Patrick Robberecht, et. al [ A new type of functional VIP receptor has an affinity for helodermin in human SUP-T1 lymphoblasts ] pp. 351-355	1-3
※引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリーの文献		
IV. 認証		
国際調査を完了した日 05.01.91	国際調査報告の発送日 21.01.91	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 前田憲彦	4 H 8 3 1 8

## 第2ページから続く情報

	( 田欄の続き )	
X	Peptides ( Fayetteville , N.Y. ) , 7 ( Suppl. 1 ) ( 1986 ) Patrick Robberecht , et. al [ Interaction of synthetic amino - and carboxy - terminal fragments of helodermin with rat liver VIP receptors ] pp. 79 - 82	1 - 3
X	Peptides ( Fayetteville , N.Y. ) , 7 ( Suppl. 1 ) ( 1986 ) S. Naruse , et. al [ Helodermin has a VIP - like effect upon canine blood flow ] pp. 237 - 240	1 - 3

V.  一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI.  発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1.  追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2.  追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_

3.  追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_

4.  追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかつた。

## 追加手数料異議の申立てに関する注意

- 追加して納付すべき手数料の納付とともに、追加手数料異議の申立てがされた。
- 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかつた。

III. 関連する技術に関する文献（第2ページからの続き）		
引用文献の カテゴリ	引用文献名及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
X	JP, A, 61-118399 (大塚製薬株式会社), 5. 6月. 1986 (05. 06. 86), 第1頁-第2頁, (ファミリーなし)	1-3

**This Page Blank (uspto)**